顺铂处理癌细胞后 *CDC25* mRNA 剪接异构体的变化*

杨梦莉[1]，陈香岭[1]，马春霞[1]，姚宇峰[1]，史 荔[1]，马千里[2]，俞建昆[1]**
（1. 中国医学科学院 & 北京协和医学院 医学生物学研究所，云南 昆明 650118；2. 昆明医学大学第三附属医院 胸外科，云南 昆明 650118）

［摘 要］**目的：**探讨顺铂（CDDP）对肺癌、宫颈癌细胞和人胚肾细胞 *CDC25* 磷酸酶 mRNA 的选择性剪接的影响。**方法：**将培养的肺癌 A549 和 H1299 细胞，宫颈癌 C33A、SiHa、CaSki 细胞及人胚肾 293FT 细胞分为实验组和对照组，实验组细胞用 CDDP 处理，对照组细胞用 DMSO 处理，设计 *CDC25A*、*CDC25B*、*CDC25C* 引物，利用 RT-PCR 检测 *CDC25* mRNA 剪接异构体的表达变化。**结果：**与对照组细胞比较，随着 CDDP 浓度的增加，肺癌 A549 和 H1299 细胞，宫颈癌 C33A、SiHa 和 CaSki 细胞以及人胚肾 293FT 细胞中 *CDC25B*、*CDC25C* mRNA 剪接异构体比例有明显变化，而 *CDC25A* mRNA 剪接异构体变化不明显。**结论：**CDDP 引起细胞 DNA 损伤时，可发生 *CDC25* mRNA 选择性剪接异构体的比例发生变化，这可能与肿瘤药物治疗时的抗性有关。

［关键词］CDC25 磷酸酶；mRNA 剪接异构体；顺铂；肿瘤细胞，培养的；聚合酶链式反应；DNA 损伤
［中图分类号］R73－3；R512.6；R737.33 ［文献标识码］A ［文章编号］1000-2707(2017)02-0159-06
DOI：10.19367/j.cnki.1000-2707.2017.02.008

Splice Isoforms of *CDC25* mRNA and Their Changes in Cancer Cells after Treatment with Cisplatin

YANG Mengli[1], CHEN Xiangling[1], MA Chunxia[1], YAO Yufeng[1], SHI Li[1], MA Qianli[2], YU Jiankun[1]
(*1. Chinese Academy of Medical Sciences & Institute of Medical Biology, Peking Union Medical College, Kunming 650118, Yunnan, China; 2. Department of Thoracic Surgery, the Third Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650118, Yunnan, China*)

［**Abstract**］**Objective**: To investigate the influence of cis-platinum (CDDP) on alternative splicing of phosphatase mRNA in lung cancer, cervical cancer cells, and human embryonic kidney cells CDC25 (cell division cycle 25). **Methods**: Artificially cultured cell lines including lung cancer cells of A549, and H1299, cervical cancer cells of C33A, SiHa, and CaSki, and human embryonic kidney cell of 293FT were used and experimental group and control group were established with them. Cells in experimental group were treated with CDDP, while cells in control group treated with DMSO. Primers of *CDC25A*, *CDC25B*, *CDC25C* were designed and changes of *CDC25* mRNA alternative splicing expression were detected with RT-PCR. **Results**: In all the cell lines of experimental group, *CDC25B* and *CDC25C* mRNA alternative splicing isoform ratio changed markedly, but the change of *CDC25A* mRNA alternative splicing isoform was not obvious. **Conclusion**: When CDDP causes cell DNA damage, *CDC25C* mRNA alternative splicing isoform ratio change might happen, which may relate with the resistance to tumor drugs.

［**Key words**］CDC25 phosphatase; mRNA alternative splicing isoform; cisplatin; tumor cells, cultured; polymerase chain reaction; DNA damage

*［基金项目］中国医学科学院病原生物学研究所基本科研业务费项目（2012IPB107）；高等学校博士学科点专项科研基金（新教师类，20111106120056）
**通信作者 E-mail：yjk@imbcams.com.cn
网络出版时间：2017－02－17 网络出版地址：http://www.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20170217.1104.014.html

CDC25(cell division cycle 25)磷酸酶是细胞周期调控蛋白,在正常的细胞周期和对 DNA 损伤的检测点反应中都有重要的功能[1]。CDC25 的功能主要是去除与 cyclin 形成复合物的 CDKs(cyclin-dependent kinases)上起抑制作用的磷酸而激活该复合物,以确保一个适当的 CDKs-Cyclin 活性水平,使细胞分裂按正确的时序进行,同时保证基因组的稳定性。目前哺乳动物中 CDC25 中有 3 个成员,分别为 CDC25A、CDC25B 和 CDC25C,它们都参与调节 G_1/S 和 G_2/M 的转换,并在 M 期中发挥作用,细胞通过磷酸化、亚细胞定位和蛋白酶体复合物介导的降解精确地调节 CDC25 磷酸酶的活性,以保证细胞从 G_2 进入 M 期[2-3]。目前,研究发现 CDC25 存在选择性剪接现象,产生 5 种剪接异构体[4-5]。研究表明,被试剂或辐射处理出现 DNA 损伤细胞中的一些与细胞周期和凋亡相关的基因会发生选择性剪接[6]。抗癌药物顺铂(cisplatin ,CDDP)可引起 DNA 链断裂,发生诱导细胞凋亡的作用。本研究用 CDDP 处理两株肺癌细胞、3 株宫颈癌细胞及 1 株人胚肾细胞,观察 *CDC25A*、*CDC25B*、*CDC25C* mRNA 剪接异构体的变化及这些异构体的比例变化,探讨肿瘤细胞对 CDDP 产生抗性的机理,为提高其疗效提供新靶点和途径。

1　材料与方法

1.1　细胞及试剂

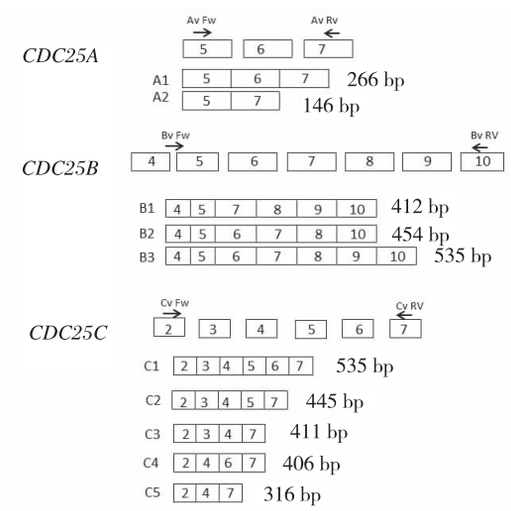
肺癌细胞 NCI-H1299、宫颈癌 C33A、SiHa 和 CaSki 细胞及人胚肾细胞 HEK293T(购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库/中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心),肺癌细胞 A549(购自中国科学院昆明动物所细胞中心),Hyclone 改良型 RPMI-1640 培养基(含 10% FBS,青霉素和链霉素浓度分别为 100 000 U/L 和 100 000 μg/L,培养 NCI-H1299 细胞),Hyclone DMEM/HIGH GLUCOSE 培养液(含 10% FBS,青霉素和链霉素浓度分别为 100 000 U/L 和 100 000 μg/L,培养 NCI-H1299 外的其他细胞),CDDP(购自 Sigma Aldrich 公司)。

1.2　方法

1.2.1　细胞分组　6 种肿瘤细胞都分为实验组和对照组,实验组细胞用不同浓度的 CDDP 处理,对照组细胞用相应浓度的 DMSO 处理(DMSO 加入量为 CDDP 的最大浓度)。CDDP 按照 100 000 μmol/L 浓度进行稀释,DMSO 加入体积应小于细胞培养液的 1/1 000。实验组中 A549 浓度为 7、14、21、28、35、42、49 及 56 μmol/L, H1299CDDP、C33A、293FT 浓度为 9、18、27、36、45、54 及 63 μmol/L, SiHa 浓度为 8、16、24、32、40、48 及 56 μmol/L, CaSki 浓度为 6、18、24、30、36 及42 μmol/L。培养条件为 37 ℃、5% 的 CO_2。CDDP 用 DMSO 溶解后使用,CDDP 加入时细胞处于对数增长期,在培养皿表面的覆盖率大约在 70% ~90% 之间。

1.2.2　总 RNA 的提取　细胞在 CDDP 处理 24 h 时,按照试剂说明书程序提取总 RNA[7]。

1.2.3　CD25 选择性剪接性基因的 RT-PCR　以 oligo(dT)18 引物用 PrimeScript Ⅱ逆转录酶(TaKaRa 公司)进行逆转录反应得到 cDNA 第 1 链,再用 PCR 引物进行 PCR 扩增检测。*CDC25* 选择性剪接基因结构如图 1 所示,设计 *CDC25A* 上游引物为 5′-GGGGGACTGTCGCCTGTCACCAACCT-3′, 下游引物为 5′-GGGGTCTCCTCCTCATTCTTCAGATTC-3′; *CDC25B* 上游引物为 5′-GCTTCCTCGCCGGTCACCAC-3′, 下游引物为 5′-CCTGCGGCTGGCCCACTC-3′; *CDC25C* 上游引物为5′-CTCCTGGA



注:*CDC25A*、*CDC25B* 及 *CDC25C* 为 pre-mRNA 选择性剪接序列示意图,Av、Bv 及 Cv 和箭头表示进行 RT-PCR 时,扩增不同 *CDC25A*、*CDC25B* 及 *CDC25C* 异构体引物设计位置;A1、A2 表示 *CDC25A* 的 2 种不同剪接异构体,B1、B2 及 B3 表示 *CDC25B* 的 3 种不同剪接异构体,C1、C2、C3、C4 及 C5 表示 *CDC25C* 的 5 种不同剪接异构体

图 1　*CDC25* 选择性剪接基因结构图

Fig. 1　Structure diagram of *CDC25* gene alternative splicing

GAGAGACACTTCCTTTAC-3′，下游引物为 5′-CCACTTCTGCTCACCTTTGCTTCTTG-3′。PCR 反应总体积 20 μL，反应条件为 94 ℃ 预变性 3 min，94 ℃变性 30 s、60 ℃退火 30 s、72 ℃延伸 45 s，35 次循环，72 ℃最后延伸5 min。PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。

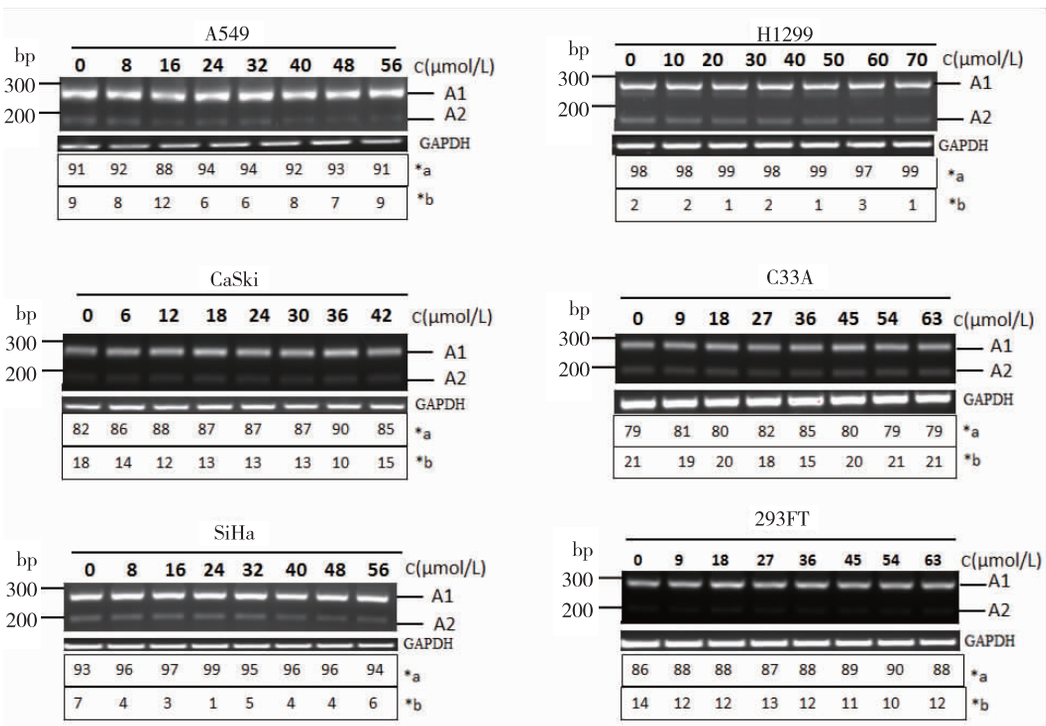
1.3　数据分析

实验所得数据用 Bio-RAD 凝胶成像仪自带分析软件处理，分别框选 *CDC*25*A*、*CDC*25*B* 及 *CDC*25*C* mRNA 目的异构体条带，选取其中一个目的条带作为背景参考值，通过软件分析得出各异构体所占比例。取 3 次实验结果平均值作最终数值。

2　结果

2.1　*CDC*25*A* mRNA 异构体的变化

如图 2，与对照组细胞比较，实验组 A549、H1299、293FT、C33A、SiHa 及 CaSki 细胞随着 CDDP 浓度的增加，*CDC*25*A* A1、A2 异构体变化趋势不明显。



注：C 表示 CDDP 浓度，A1 表示 266 bp 的 *CDC*25*A* 异构体，A2 表示 146 bp 异构体；GAPDH 为内对照，＊a 表示 *CDC*25*A* A1 异构体剪接百分比，＊b 表示 *CDC*25*A* A2 异构体剪接百分比

图 2　6 种肿瘤细胞中 *CDC*25*A* mRNA 异构体的变化

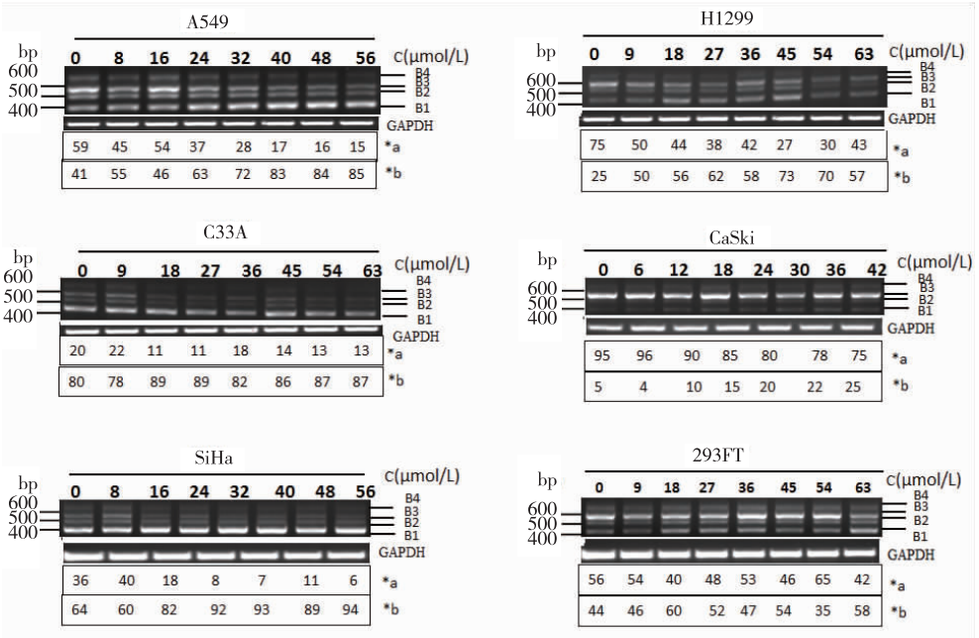
Fig. 2　Changes of alternative splicing isoform of *CDC*25*A* mRNA in tumor cells after treated with different doses of cisplatin

2.2　*CDC*25*B* mRNA 异构体的变化

如图 3，在 CDDP 处理下，得到 *CDC*25*B*1，*CDC*25*B*3 异构体剪接比例发生改变，*CDC*25*B*2 和 *CDC*25*B*4 为非特异性扩增条带。与对照细胞比较，在实验组 A549、H1299、293FT、CaSki、C33A 和 SiHa 细胞随着 CDDP 浓度的增加，*CDC*25*B*3 异构体的比例呈逐渐降低的趋势，而 *CDC*25*B*1 异构体的比例逐渐增加。

2.3　*CDC*25*C* mRNA 异构体的变化

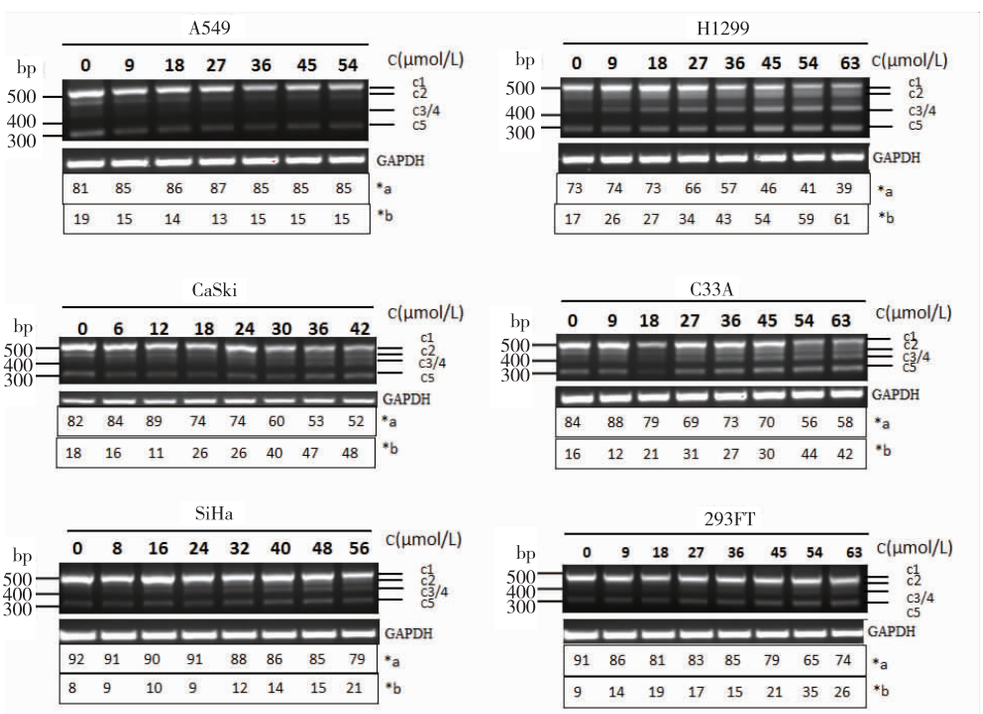
如图 4，与对照细胞比较，实验组 H1299、293FT、CaSki、C33A 和 SiHa 细胞随着 CDDP 浓度的增加，*CDC*25*C*1 异构体的比例呈逐渐降低的趋势，而 *CDC*25*C*3/*C*4 和 *CDC*25*C*5 异构体的比例逐渐增加，但在肺癌 A549 细胞中，异构体 *CDC*25*C*1、*CDC*25*C*5 随着 CDDP 浓度的增加，异构体比例逐渐降低。



注:C 表示 CDDP 浓度,B1 表示 412 bp 异构体, B2、B4 表示非特异性扩增条带, B3 表示 535 bp *CDC25B* 异构体; GAPDH 为内对照, * a 表示 *CDC25B*3 异构体剪接百分比, * b 表示 *CDC25B*1 异构体剪接百分比

图 3　6 种肿瘤细胞中 *CDC25B* mRNA 异构体的变化

Fig. 3　Changes of alternative splicing isoform of *CDC25B* mRNA in tumor cells after treated with different doses of cisplatin



注:C 表示 CDDP 浓度, C1 表示 535 bp *CDC25C* 异构体,C2 表示 445 bp 异构体,C3 表示 411 bp 异构体, C4 表示 406 bp 异构体, C5 表示 316 bp 异构体;GAPDH 为内对照, * a 表示 *CDC25C*1 异构体剪接百分比, * b 表示 *CDC25C*5 异构体剪接百分比

图 4　6 种肿瘤细胞中 *CDC25C* mRNA 异构体的变化

Fig. 4　Changes of alternative splicing isoform of *CDC25C* mRNA in tumor cells after treated with different doses of cisplatin

3　讨论

*CDC*25 磷酸酶在细胞周期进程中具有重要的调控功能，有 3 种基因亚型：*CDC*25*A*、*CDC*25*B* 及 *CDC*25*C*[7]。都与 P53 转录相关，*CDC*25*A* 转录后的蛋白酶依赖水平和 *CDC*25*B*、*CDC*25*C* 参与的细胞质进程都与 *CDC*25 应对 DNA 损伤诱导有着密切的联系[8]。Albert 等[6]研究表明，利用不同浓度的 Doxorubicin 处理细胞造成 DNA 损伤，*CDC*25*C*5/*C*1 在 mRNA 水平比例增加，而 *CDC*25*A* 和 *CDC*25*B* 剪接异构体变化不明显，说明 3 种 *CDC*25 剪接异构体调控途径不同。本研究结果显示，利用不同浓度的 CDDP 造成细胞的 DNA 损伤，*CDC*25*A* 剪接异构体 A1、A2 变化不明显，但 *CDC*25*B*1/*B*3，*CDC*25*C*5/*C*1 比例逐渐增加，此结果与之前研究结果不一致，推测利用 CDDP 造成细胞 DNA 损伤时，*CDC*25*A* 与 *CDC*25*B*、*CDC*25*C* 的剪接异构体调控途径不同，究竟是如何进行调控还有待进一步探究。

在 CDDP 处理下，*CDC*25 异构体比例间发生了变化，本研究选用比例变化最大的目标条带作为研究，由此探究该异构体比例的变化与 CDDP 之间的关系。已有研究表明，利用耐药细胞和药敏感细胞进行 *CDC*25 异构体表达研究，*CDC*25*A*2、*CDC*25*B*2、*CDC*25*C*5/*C*1 在耐受细胞中呈高表达状态[9]。本研究结果显示，选用的肺癌、宫颈癌、人胚肾细胞随着 CDDP 浓度的增加，*CDC*25*A*2 变化不明显，而 *CDC*25*B*3、*CDC*25*C*5 和 *C*1 随着 CDDP 浓度的增加，比例逐渐升高。推测可能原因是随着 CDDP 浓度的增加，异构体 *CDC*25*B*3、*CDC*25*C*5 和 *C*1 比例增加这一的变化能增加细胞凋亡抵抗，与癌症细胞的耐受对药物有关，并且浓度越高，耐受性越强。已有的研究表明，在 DNA 损伤情况下，*CDC*25*B*、*C* 功能活性的调控与 G_2/M 检查点检测密切相关[10-11]。特别在 P53 缺失的细胞中，因 P53 的缺失使得 G_1/S 检查点的功能被削弱，而 G_2/M 检查点在阻止细胞进入有丝分裂进行 DNA 修复中发挥重要作用。由此说明，CDDP 浓度的增加，异构体 *CDC*25*B*3、*CDC*25*C*5 和 *C*1 比例增加，导致更多受损伤的细胞停留在 G_2/M 进行 DNA 修复，此变化与细胞对药物的耐受有关。另外，随着 CDDP 的增加，*CDC*25*C*3/*C*4 异构体比例也逐渐增加，表现出与 *CDC*25*C*5 和 *C*1 相一致的变化趋势，推测 *CDC*25*C*3/*C*4 异构体比例逐渐增加这一变化可能也与细胞耐受有关。

本研究利用不同浓度的 CDDP 处理不同癌细胞，以此探究未用 CDDP 浓度处理和梯度 CDDP 浓度处理细胞后，*CDC*25 mRNA 剪接异构体的变化，结果显示随着 CDDP 浓度的增加，*CDC*25 mRNA 剪接异构体比例发生变化，且这一变化，在肺癌、宫颈癌、人胚肾细胞中得到了验证，说明该现象具有一定的普遍性。Masaharu 等[12]报道利用电离辐射对癌细胞造成 DNA 损伤，在不同剂量辐射处理下，细胞周期相关基因发生剪接变化且引起该变化的信号通路不同。Jana 等[13]证实 DNA 引起的损伤下，主要通过 ATM-CHEK2-CDC25-cdc2/cyclin-B 信号通路进行调控，而 Kim 等[14]报道在 DNA 损伤下，信号通路 ATM/ATR-Chk1/Chk2 为主要的调控途径，但目前针对在低浓度和高浓度的 CDDP 处理下，*CDC*25 剪接异构体发生改变，调控 *CDC*25 剪接变化的信号通路还未有人报道，因此引起剪接异构体变化的信号通路值得深入研究，结果将有助于解读细胞对 CDDP 产生抗性的机理，为提高其疗效提供新靶点和途径。

4　参考文献

[1] Boutros R, Dozier C, Ducommun B, et al. When and wheres of CDC25 phosphatases[J]. Curr Opin Cell Biol, 2006(18):185-191.

[2] Jinno S, SutoK, Nagata A, et al. CDC25A is a novel phosphatase functioning early in the cell cycle[J]. EMBO J, 1994(13):1549-1556.

[3] Aressy B, Ducommun B. Cell cycle control by the CDC25 phosphatases[J]. Anticancer Agents Med Chem, 2008(8): 818-824.

[4] Wegener S, Hampe W, HerrmannD, et al. Alternative splicing in the regulatory region of the human phosphatases CDC25A and CDC25C[J]. Eur J Cell Bio, 2000(79):810-815.

[5] Bureik M, Rief N, DrescherR, et al. An additional transcript of the cdc25C gene from A431 cells encodesa functional protein[J]. Int J Oncol, 2000 (17): 1251-1258.

[6] Albert H, Battaglia E, Monteiro CD, et al. Genotoxic stress modulates CDC25C phosphatase alternative splicing in human breast cancer cell lines[J]. Molecular oncology, 2012(6):542-552.

[7] Dalvai M, Mondesert O, Bourdon J, et al. Cdc25B is negatively regulated by p53 through Sp1 and NF-Y tran-

scription factors[J]. Oncogene, 2009(30): 2282 - 2288.
[8] Karlsson-Rosenthal C, Millar J. Cdc25: mechanisms of checkpoint inhibition and recovery[J]. Trends Cell Biol, 2006(16): 285 - 292.
[9] Helene A, Susana S, Eric B, et al. Differential expression of CDC25 phosphatases splice variants in human breast cancer cells[J]. Clin Chem Lab Med, 2011(10): 1707 - 1714.
[10] Boutros R, Lobjois V, Ducommun B. CDC25 phosphatases in cancer cells: key players? Good targets? Nat Rev Cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2007(7): 495 - 507.
[11] Karlsson-Rosenthal C, Millar JB. Cdc25: mechanisms of checkpoint inhibition and recovery[J]. Trends Cell Biol, 2006(6): 285 - 292.
[12] Masaharu A, Kohji O, Takeshi K, et al. Telomerase activation as a repair response to radiation-induced DNA damage in Y79 retinoblastoma cells[J]. CANCER LETTERS, 2013(340)82 - 87.
[13] Jana K, Marcin K, Igor V. et al. Exon-centric regulation of ATM expression is population-dependent and amenable to antisense modification by pseudoexon targeting[J]. Scientific reports, 2016(6): 18741.
[14] Kim KY, Jang WY, Lee JY. et al. Kaempferol activates G2-checkpoint of the cell cycle resulting in G2-arrest and mitochondria-dependent apoptosis in human acute leukemia jurkat T cells[J]. J Microbiol Biotechnol, 2016(2): 287 - 294.

(2016-11-25 收稿,2017-01-20 修回)
中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 苏晓庆

(上接第 154 页)

[12] Kobow K, Auvin S, Jensen F, et al. Finding a better dIug for epilepsy: antiepileptogenesis argets [J]. Epnepsia, 2012(11): 1868 - 1876.
[13] Post RM. Neurobiology of seizures and behavioral abnormalities[J]. Epilepsia, 2004(2): 5 - 14.
[14] Russmann V, Salvamoser JD, Rettenbeck ML, et al. Synergism of perampanel and zonisamide in the rat amygdala kindling model of temporal lobe epilepsy[J]. Epilepsia, 2016(4): 638 - 647.
[15] Goddard GV. The kindling model of epilepsy[J]. Trends Neurosci, 1983(6): 275 - 279.

(2016-10-20 收稿,2017-01-25 修回)
中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 赵 毅

(上接第 158 页)

[6] He Q, Pu J, Yuan A, et al. Liver X receptor agonist treatment attenuates cardiac dysfunction in type 2 diabetic db/db mice [J]. Cardiovasc Diabetol, 2014(13): 149.
[7] Calkin AC, Tontonoz P. Transcriptional integration of metabolism by the nuclear sterol-activated receptors LXR and FXR [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012(4): 213 - 224.
[8] Cheng Y, Liu G, Pan Q, et al. Elevated expression of liver X receptor alpha (LXRalpha) in myocardium of streptozotocin-induced diabetic rats [J]. Inflammation, 2011(6): 698 - 706.
[9] Cheng Y, Feng Y, Zhu M, et al. Synthetic liver X receptor agonist T0901317 attenuates high glucose-induced oxidative stress, mitochondrial damage and apoptosis in cardiomyocytes [J]. Acta Histochem, 2014(1): 214 - 221.

(2016-11-05 收稿,2017-02-07 修回)
中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 赵 毅